

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS MEXICANAS DEL HONGO COMESTIBLE Lentinus boryanus Y DETERMINACIÓN DE SU PATRÓN DE SEXUALIDAD *

por Gerardo Mata ** y
Gastón Guzmán **

CHARACTERIZATION OF MEXICAN STRAINS OF THE EDIBLE MUSHROOM Lentinus boryanus AND DETERMINATION OF ITS SEX PATTERN

SUMMARY

Two native strains of Lentinus boryanus (Berk. et Mont.) Sing. (= L. cubensis B. et C.) from Xalapa, Veracruz zone were studied. The mycelial growth in five different temperatures (30, 27.5, 25, 22 and 20°C) and in four solid media (potato dextrose agar, malt extract agar, Sabouraud dextrose agar and dextrose agar) was studied. At 20-22°C the strains showed the optimal growth in potato dextrose and malt extract. A tetrapolar heterothallic sex pattern was observed.

RESUMEN

Se experimentaron dos cepas de Lentinus boryanus (Berk. et Mont.) Sing. (= L. cubensis B. et C.) aisladas de especímenes colectados en la región de Xalapa, Ver. Se estudió el crecimiento del micelio bajo cinco temperaturas diferentes (30, 27.5, 25, 22 y 20°C) y cuatro medios de cultivo sólido (papa dextrosa agar, extracto de malta agar, agar dextrosa Sabouraud y agar de dextrosa). El desarrollo óptimo para esta especie se encontró en el intervalo de 20-22°C en los medios de papa dextrosa y extracto de malta. El patrón de sexualidad se determinó como heterotálico tetrapolar.

INTRODUCCION

Lentinus boryanus (Berk. et Mont.) Sing. que se conoce también con el nombre de L. cubensis B. et C., es un hongo comestible de amplia distribución en México (Mata y Guzmán, 1989), con posibilidades a ser cultivado industrialmente, debido a sus relaciones con L. edodes (Berk.) Sing. y una especie comestible en el este asiático conocida en Japón como shiitake y de mucha importancia comercial. Dada la diversidad de hongos comestibles de los bosques de México, es necesario estudiar las especies que como L. boryanus pueden ser objeto de cultivo, en virtud de que actualmente sólo se cultivan comercialmente tres: Agaricus bisporus (Lange) Imbach, A. bitorquis (Quél.) Sacc. y Pleurotus ostreatus (Jacq. : Fr.) Kumm. y se han hecho experimentos con Volvariella volvacea (Bull. : Fr.) Sing. [= V. bakeri (Murr.) Shaff.], Auricularia polytricha (Mont.) Sacc. y A. fuscusuccinea (Mont.) Farl. (Guzmán, 1983; Martínez et al., 1984).

* Esta investigación forma parte de la tesis de Maestría del primer autor.

** Instituto de Ecología, A.C., Apartado Postal 63, Xalapa, Veracruz.

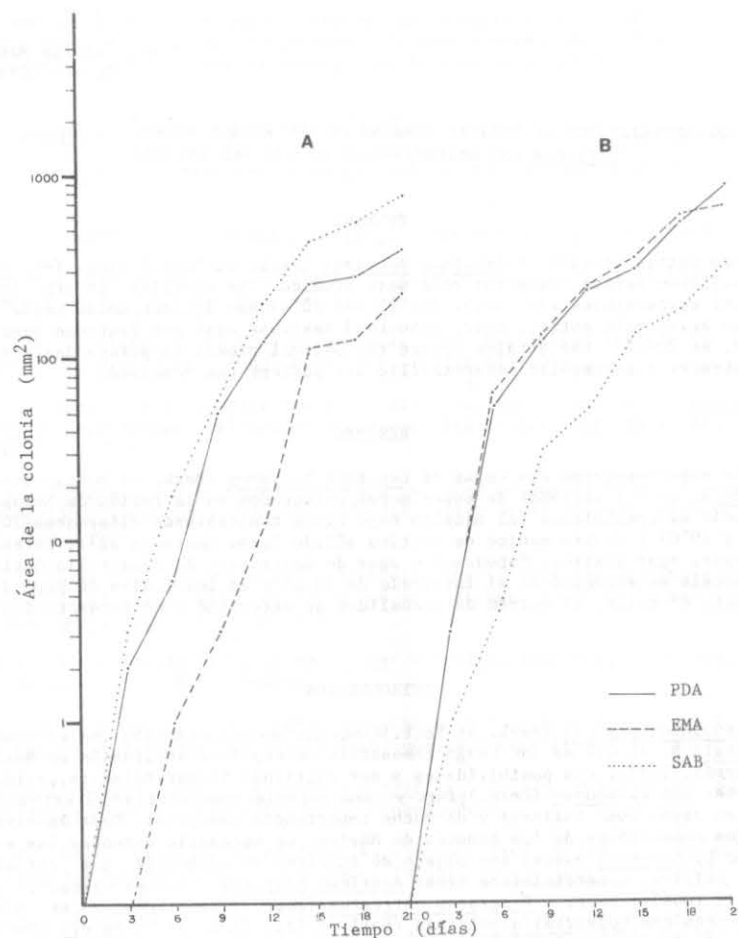


Fig. 1. Crecimiento del micelio de las cepas 17(A) y 67(B) de *L. boryanus* a 27.5°C en cuatro medios de cultivo.

La producción de hongos comestibles a partir de subproductos agrícolas, agroindustriales y forestales es ya una alternativa viable, como Guzmán y Martínez-Carrera (1985) lo demostraron en la pulpa de café. En México se generan grandes cantidades de subproductos agroindustriales y forestales que bien pueden ser utilizados para el cultivo de hongos comestibles (Mata y Martínez-Carrera, 1988).

MATERIALES Y METODOS

Cepas. Las cepas estudiadas en este trabajo, se encuentran depositadas en el Cepario de hongos comestibles del Instituto de Ecología (antes INIREB) (Martínez-Carrera et al., 1988). Se realizó la caracterización de 2 cepas mexicanas de *Lentinus boryanus* registradas en el Instituto de Ecología como INIREB 17 e INIREB 67. El patrón de sexualidad se determinó con 12 micelios monospóricos aislados de la esporada del ejemplar Mata 285, el cual se encuentra depositado en el Herbario XAL. Dichos micelios monospóricos se obtuvieron haciendo diluciones a partir de las esporas contenidas en una superficie de 1 cm², en 25 ml de agua destilada estéril. Se colocaron 0.5 ml de la dilución en cajas de Petri con papa dextrosa agar (PDA) y se incubaron a 20°C. La procedencia del material estudiado se muestra en la tabla 1.

Caracterización de cepas nativas. Las cepas de *Lentinus boryanus* 17 y 67 se sembraron en 4 medios de cultivo sólidos: papa dextrosa agar (PDA), extracto de malta agar (EMA), agar de dextrosa Sabouraud (SAB) y agar de dextrosa (DEXT), todos de Bioxon. Se utilizaron cajas de Petri de 90 mm de diámetro y 15 mm de profundidad. Se incubaron por triplicado a 30, 27.5, 25, 22 y 20°C en condiciones de oscuridad. Las cajas se revisaron cada tercer día y se midió el diámetro de la colonia para poder estimar el área de la misma. La última medición se efectuó a los 21 días, que fue cuando en determinadas condiciones, el micelio cubrió toda la superficie de la caja. La caracterización se realizó de acuerdo a Mata (1987).

Los datos de la velocidad de crecimiento fueron estudiados con un programa de cómputo que permitió realizar un análisis multivariado de la variancia, el cual puede establecer diferencias entre las temperaturas y los medios de cultivo empleados. Se utilizó además el método de comparaciones múltiples de Bonferroni (Dunn y Clark, 1974), para determinar al 95 % de significancia, la similitud de las medias de crecimiento ($\bar{X}$) en cada una de las condiciones probadas.

Determinación del patrón de sexualidad. El patrón de sexualidad se determinó con los micelios monospóricos aislados, de los cuales se escogieron 12 al azar y se entrecruzaron en todas las combinaciones posibles para determinar, de acuerdo a Eger (1978), las clases de incompatibilidad. Se consideraron positivos los casos en que se formaron ffbulas, lo que indica el estado dicariótico (Mori et al., 1976).

RESULTADOS

1) Caracterización de las cepas

CEPA 17

A) Temperatura a 30°C. No hubo crecimiento en ningún medio.

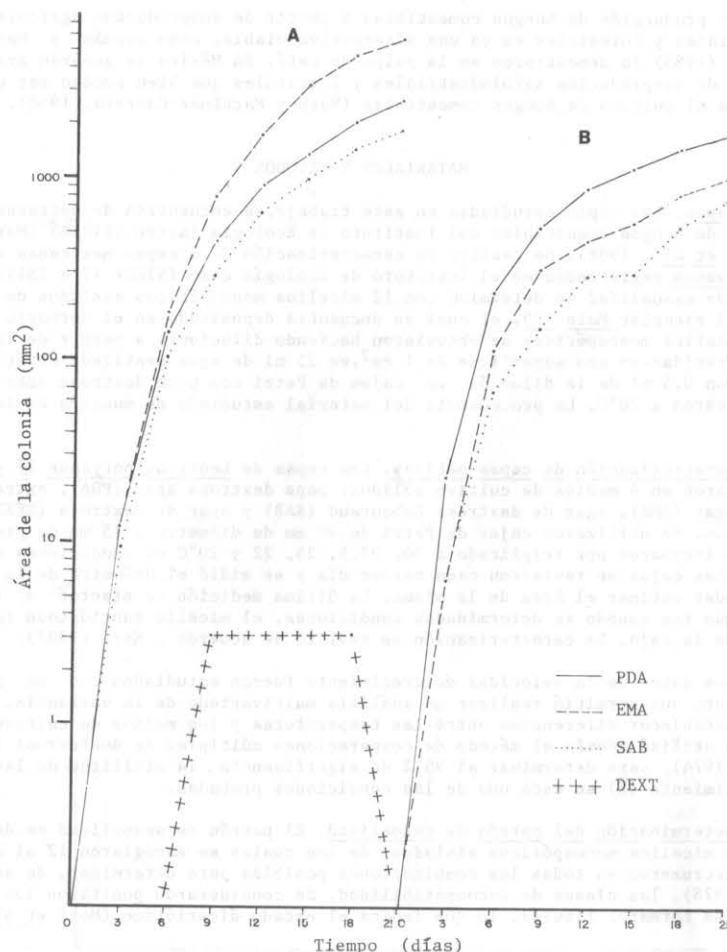


Fig. 2. Crecimiento del micelio de las cepas 17(A) y 67(B) de *L. boryanus* a 25°C en cuatro medios de cultivo.

B) Temperatura a 27.5°C. En DEXT el micelio no creció. En los medios restantes, el micelio fue blanco con textura algodonosa, sin hifas aéreas. En SAB el micelio fue el más denso. En PDA y SAB creció uniforme y radialmente y en EMA fue uniforme pero no radial. A los 21 días la superficie promedio de los micelios fue de 382 mm² en PDA, 223 mm² en EMA y 771 mm² en SAB.

C) Temperatura a 25°C. En DEXT el micelio no creció. En PDA, EMA y SAB el micelio fue blanco, uniforme, sin hifas aéreas y textura algodonosa, sin embargo, en PDA y EMA se presentaron pequeñas agregaciones hifales. La mayor densidad de crecimiento se observó en SAB. A los 21 días el área promedio de las colonias fue de 2648 mm² en PDA, 5815 mm² en EMA y 1865 mm² en SAB.

D) Temperatura a 22°C. En DEXT las colonias sólo alcanzaron en promedio 6 mm² del área. En los otros medios de cultivo el micelio fue blanco sin hifas aéreas. En PDA el micelio fue uniforme no radial, con textura algodonosa-lanosa. En EMA creció uniforme con la densidad más alta en esta temperatura y textura lanosa. En SAB fue uniforme con textura algodonosa y presentó un exudado de aspecto oleoso, transparente a de color café oscuro. A los 21 días las colonias tuvieron una superficie promedio de 4960 mm² en PDA, 5463 mm² en EMA y 3423 mm² en SAB.

E) Temperatura a 20°C. En DEXT los micelios sólo alcanzaron 6 mm² del área. En los otros medios el micelio fue blanco, uniforme y con hifas aéreas escasas. En PDA y EMA presentó textura lanosa aunque en el segundo, que fue el más denso, se observó un exudado transparente a de color café oscuro. En SAB la textura fue lanosa. A los 21 días el área promedio de los micelios fue de 5414 mm² en PDA, 6361 mm² en EMA y 3658 mm² en SAB.

En las figuras 1-4 se esquematiza el crecimiento de los micelios de la cepa estudiada, en los cuatro medios bajo los cuatro tipos de temperatura. Se puede observar que a los 21 días habían alcanzado su óptimo crecimiento, excepto en el medio DEXT a los 27.5 y 25°C.

Microscópicamente, se observó en PDA, EMA y SAB, hifas regulares a ligeramente varicosas, hialinas, de pared delgada, con ramificación dicotómica y diámetro de 2.4-4.8 µm. En PDA se observaron en la periferia de la colonia hifas varicosas a subglobosas con ramificaciones de tipo dicotómico o acremoniforme y anastomosis en forma de H. En EMA se detectaron unas hifas ensanchadas de color café ferruginoso y otras varicosas hialinas; las primeras mostraron protuberancias terminales e intercalares, muy semejantes a clamidosporas. En SAB también se encontraron células parecidas a las precursoras de clamidosporas y en EMA y SAB dichas estructuras tuvieron un diámetro de 4.8-8.0 µm. En DEXT como se dijo anteriormente, el micelio no creció o dicho crecimiento fue insignificante.

CEPA 67

A) Temperatura a 30°C. No hubo crecimiento en ningún medio.

B) Temperatura a 27.5°C. En DEXT no hubo crecimiento. En los otros medios el micelio fue blanco, sin hifas aéreas y textura algodonosa. En PDA fue uniforme pero no radial, con algunas agregaciones hifales y exudados de aspecto oleoso. En

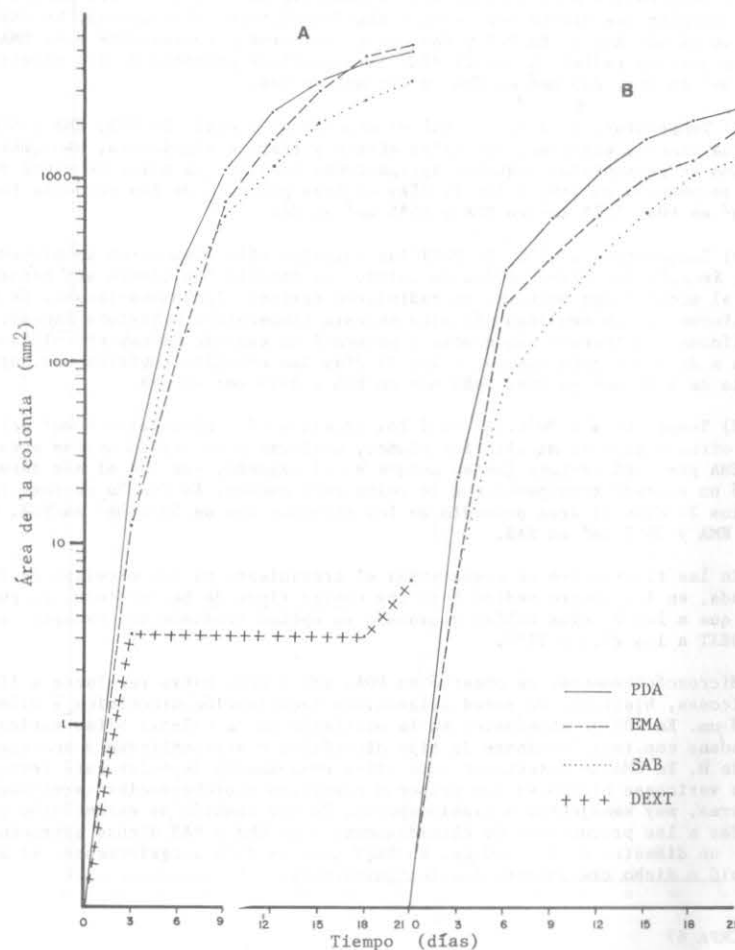


Fig. 3 Crecimiento del micelio de las cepas 17(A) y 67(B) de *L. boryanus* a 22°C en cuatro medios de cultivo.

EMA fue el más denso de esta temperatura y formó círculos concéntricos irregulares y con pliegues. En SAB presentó un círculo concéntrico con pliegues muy marcados y exudados de color café oscuro. A los 21 días las colonias tuvieron una superficie promedio de 822 mm² en PDA, 617 mm² en EMA y 314 mm² en SAB.

C) Temperatura a 25°C. En DEXT no hubo crecimiento. En los otros medios el micelio fue blanco con zonas de color café oscuro y escasas hifas aéreas. En PDA fue uniforme pero no radial y de textura lanosa. En EMA y SAB formó círculos concéntricos dentro de los cuales se presentaron pliegues de color café claro a oscuro y la textura fue algodonosa. La mayor densidad se observó en EMA. A los 21 días el área promedio de las colonias fue de 1764 mm² en PDA, 1017 mm² en EMA y 771 mm² en SAB.

D) Temperatura a 22°C. En DEXT no hubo crecimiento. En los otros tres medios el micelio fue blanco con zonas de color café oscuro y escasas hifas aéreas. En PDA presentó crecimiento no radial, con un círculo concéntrico no uniforme y textura lanosa. En EMA se diferenciaron 2 zonas, una con micelio blanco y exudado oleoso y otra con hifas de color café claro y postradas. En SAB formó círculos concéntricos con pliegues y las hifas de color café claro y textura algodonosa. A los 21 días la superficie promedio de los micelios fue de 2466 mm² en PDA, 1912 mm² en EMA y 1299 mm² en SAB.

E) Temperatura a 20°C. En DEXT no hubo crecimiento. En los otros medios el micelio fue blanco con zonas de color café claro y escasas hifas aéreas. En PDA fue uniforme pero no radial, con textura lanosa. En EMA se distinguieron tres zonas, una de micelio blanco, uniforme y textura lanosa; otra central, con exudados de color café oscuro y la zona periférica con micelio escaso e hifas postradas. En SAB formó un semicírculo de color café claro con pliegues y textura algodonosa. A los 21 días la superficie promedio del micelio fue de 4001 mm² en PDA, 2330 mm² en EMA y 1664 mm² en SAB.

En las figuras 1-4 se representa en comparación con la cepa 17, el crecimiento del micelio en los cuatro medios y bajo los cuatro tipos de temperatura antes especificadas.

Microscópicamente, se observó en PDA, EMA y SAB hifas regulares y varicosas, hialinas, de pared delgada, con ramificación dicotómica, prolongaciones acromoniformes y diámetro de 2.4-4.0 µm. En PDA en las hifas periféricas se presentaron ramificaciones prominentes y subglobosas, incluso formando cadenas. En EMA se encontraron hifas irregulares de color café oscuro y subglobosas; se observaron esporas (¿conodiosporas?) hialinas, lisas, ovoides, de pared delgada, de 12.8-7.2 x 4.8-4.0 µm. En SAB se encontraron hifas hialinas con forma de células precursoras de clamidiasporas.

El análisis estadístico produjo dos hipótesis nulas principales. La primera (H₀₁) se refiere a que no hay interacción entre los dos factores considerados: medio de cultivo y temperatura y la segunda (H₀₂) indica que no existe diferencia al interior de cada factor, es decir, que el crecimiento del hongo es igual en todas las temperaturas o en todos los medios de cultivo. La H₀₁ presentó una probabilidad de ocurrencia sumamente baja, por lo cual se rechazó y se aceptó la hipótesis alternativa (H_{a1}) que muestra que existe interacción entre los factores. Por otra parte, la H₀₂ se rechazó también por la misma razón que la anterior y se aceptó la

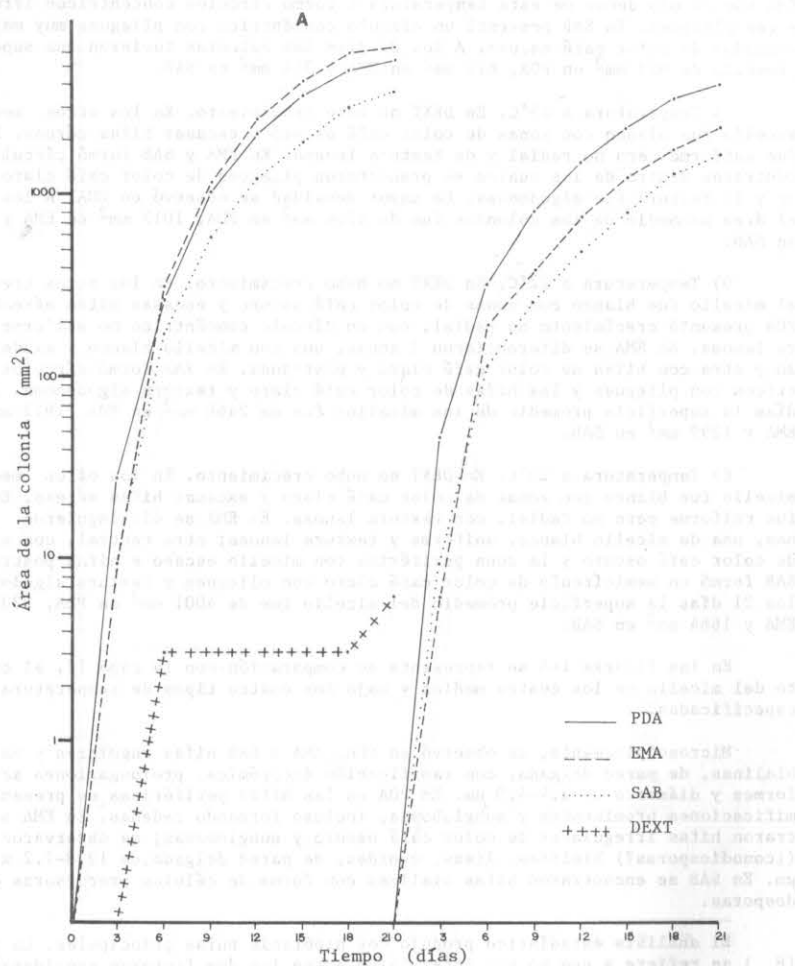


Fig. 4. Crecimiento del micelio de las cepas 17(A) y 67(B) de *L. boryanus* a 20°C en cuatro medios de cultivo.

hipótesis alternativa (H_{a2}) de que existen diferencias en el crecimiento del hongo en los distintos medios de cultivo y temperaturas estudiadas.

Los resultados del método de comparaciones múltiples de Bonferroni se observan en las tablas 2 y 3 e indican que las cepas estudiadas crecen de manera distinta en los medios de cultivo y bajo los cuatro tipos de temperatura experimentadas. Sin embargo, tanto la cepa 17 como la 67 mostraron su mayor crecimiento a los 20°C aunque en diferentes medios de cultivos, tal como se observa en la tabla 4.

2) **Determinación del patrón de sexualidad.** Al cruzar entre sí los 12 micelios monospóricos obtenidos de la esporada del ejemplar *Mata 285*, se obtuvieron 4 clases de incompatibilidad, lo que significa que *Lentinus boryanus* tiene un patrón de sexualidad de tipo heterotálico tetrapolar (Tabla 5).

DISCUSION

De las dos cepas estudiadas de *L. boryanus*, la 17 presentó mayor velocidad de crecimiento y un intervalo más amplio de temperatura óptima que la cepa 67. Esta situación es una muestra de las variaciones naturales y diferencias fisiológicas que existen en las poblaciones de hongos de una misma especie.

El crecimiento de la cepa 17 no presentó diferencias significativas entre las temperaturas 20 y 22°C en los cuatro medios de cultivo, por lo que se puede deducir que el óptimo de temperatura es en realidad más que un punto, un intervalo comprendido entre estos dos valores. Pero debido a la interacción de los dos factores: medio de cultivo y temperatura, en EMA este intervalo fue más amplio, de 20 a 25°C (Tabla 2-A).

Por otra parte, la cepa 67 mostró diferencias en el crecimiento con las $\bar{X}$ más altas, entre los 20 y 22°C, pero también en EMA presentó una variante más amplia, desde 20 a 25°C, en la que no hubo diferencias significativas con las $\bar{X}$ (Tabla 3-A). Referente a los medios de cultivo empleados, hubo diferencias significativas en el crecimiento de los micelios y el mayor crecimiento se observó para la cepa 17 en EMA y para la 67 en PDA.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a las autoridades del Instituto de Ecología y del CONACYT el apoyo recibido a sus investigaciones. Al Dr. Luis Cruz Kuri y al M. en C. Héctor Coronel, del Instituto de Ciencias Básicas de la Universidad Veracruzana, se les agradece la asesoría brindada en el manejo estadístico de los datos. Al M. en C. Daniel Martínez Carrera se le reconoce su colaboración en el inicio de este estudio. A la B101. Gloria Carrión, del Instituto de Ecología, se le agradece la revisión crítica del manuscrito. Al Sr. Edmundo Saavedra también del Instituto de Ecología, se le agradece la elaboración de las figuras.

Tabla 1. Cepas estudiadas y procedencia de las mismas.

Registro	Procedencia	Colector	Substrato
INIREB 17	Carretera Coatepec-Xalapa vía Briones, Ver.	García s/n	Madera en descomposición
INIREB 67	Parque Ecológico Fco. J. Clavijero, Xalapa, Ver.	Soto 90	Madera en descomposición
Mata 285	Parque Ecológico Fco. J. Clavijero, Xalapa, Ver.	Mata 285	Madera en descomposición

Tabla 2. Comparaciones entre las $\bar{X}$ de crecimiento de la cepa 17, en los medios de cultivo y temperaturas probadas.

A) Comparaciones entre los intervalos de temperatura en los diferentes medios de cultivo probados.

Medio de cultivo	Temperatura (°C)	20-22	20-25	20-27	20-30	22-25	22-27	22-30	25-27	25-30	27-30
PDA			*	*	*	*	*	*	*	*	*
EMA				*	*		*	*	*	*	*
SAB		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
DEXT											

B) Comparaciones entre los medios de cultivo en las diferentes temperaturas probadas.

Temperatura	Medios de cultivo	PDA-EMA	PDA-SAB	PDA-DEXT	EMA-SAB	EMA-DEXT	SAB-DEXT
20°C				*	*	*	*
22°C				*	*	*	*
25°C		*		*	*	*	*
27.5°C			*	*	*	*	*
30°C							

* Intervalos en los que se presentaron diferencias significativas al 95 %.

Tabla 3. Comparaciones entre las $\bar{X}$ de crecimiento de la cepa 67, en los medios de cultivo y temperaturas probadas.

A) Comparaciones entre los rangos de temperatura en los diferentes medios de cultivo probados.

	Temperaturas (°C)	20-22	20-25	20-27	20-30	22-25	22-27	22-30	25-27	25-30	27-30
Medio de cultivo											
PDA		*	*	*	*	*	*	*		*	
EMA				*	*		*	*	*	*	*
SAB		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
DEXT											

B) Comparaciones entre los medios de cultivo en las diferentes temperaturas probadas.

	Medio de cultivo	PDA-EMA	PDA-SAB	PDA-DEXT	EMA-SAB	EMA-DEXT	SAB-DEXT
Temperatura 20°C			*	*		*	*
22°C		*	*	*	*	*	*
25°C			*	*		*	*
27.5°C					*	*	*
30°C							

* Intervalos en los que se presentan diferencias significativas al 95 %.

Rev. Mex. Mic. 5, 1989

Tabla 4. Tamaño promedio de los micelios en mm² de las cepas estudiadas a los 21 días en los medios de cultivo y temperaturas experimentadas.

		C E P A 17					C E P A 67				
MEDIO DE CULTIVO		Temperatura					Temperatura				
		30	27.5	25	22	20°C	30	27.5	25	22	20°C
	PDA	0	382	2648	4960	5414	0	822	1764	2466	4001
	EMA	0	223	5815	5463	6361	0	617	1017	1912	2330
	SAB	0	771	1865	3423	3658	0	314	771	1299	1664
	DEXT	0	0	0	6	6	0	0	0	0	0

Rev. Mex. Mic. 5, 1989

Tabla 5. Determinación de las cuatro clases de incompatibilidad de los aislamientos monospóricos de Lentinus boryanus.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
2		-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
3			-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
4				-	-	-	+	+	-	-	-	-
5					+	-	-	-	-	+	-	-
6						-	-	-	-	-	-	-
7							+	+	-	-	-	-
8								-	+	-	+	-
9									+	-	+	-
10										-	-	-
11											-	-
12												-

I	II	III	IV
1	2	5	8
4	3		9
7	6		
10	11		
12			

LITERATURA CITADA

- Dunn, O.J. y V.A. Clark, 1974. Applied statistics analysis of variance and regresion. John Wiley and Sons, Nueva York.
- Eger, G., 1978. Biology and breeding of Pleurotus. In: Chang, S.T. y W.A. Hayes (Eds.), The biology and cultivation of edible mushrooms. Academic Press, Nueva York.
- Guzmán, G., 1983. Los hongos de la Península de Yucatán, II. Nuevas exploraciones y adiciones micológicas. Biotica 8: 71-100.
- Guzmán, G. y D. Martínez-Carrera, 1985. Planta productora de hongos comestibles sobre pulpa de café. Ciencia y Desarrollo 65: 41-48.
- Martínez, D., M. Quirarte, C. Soto, D. Salmones y G. Guzmán, 1984. Perspectivas sobre el cultivo de hongos comestibles en residuos agroindustriales en México. Bol. Soc. Mex. Mic. 19: 207-219.
- Martínez-Carrera, D., M. Sobal, M. Quirarte y G. Guzmán, 1988. El cepario de hongos comestibles del Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos. Ciencia 39: 113-120.
- Mata, G., 1987. Comportamiento de una cepa extranjera de Flammulina velutipes en tres medios de cultivo. Rev. Mex. Mic. 3: 39-46.
- Mata, G. y D. Martínez-Carrera, 1988. Estimación de la producción anual de residuos agroindustriales potencialmente utilizables para el cultivo de hongos comestibles en México. Rev. Mex. Mic. 4: 287-296.
- Mata, G. y G. Guzmán, 1989. Distribución y datos ecológicos del hongo Lentinus boryanus (Agaricales, Tricholomataceae) en México. Acta Bot. Mex. (en prensa).
- Mori, K., S. Fukai y A. Zennyozzi, 1976. Hybridization of shiitake (Lentinus edodes) between cultivated strains of Japan and wild strains grown in Taiwan and New Guinea. Mush. Sci. 9 (1): 391-403.